

铁蛋白反应器储存有毒金属离子的初步研究

林庆梅

乔玉欢 黄河清

(厦门大学环境科学研究中心 厦门 361005)

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘 要 探讨铁蛋白反应器在模拟流动海水体系中储存有毒金属离子的能力及规律。在体外, 脱铁核铁蛋白能重新构建新的铁核且核中多数铁组分经含有 5% 氯化钠的海水处理后仍可稳定于蛋白壳中, 只有少量对 H^+ 或 OH^- 较敏感的铁组分随反应体系的 pH 值增加或减少而被直接释放于介质中。此外, 铁蛋白还能储存 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 等有毒金属离子, 并释放相对应的铁量, 其储存离子量和释放 Fe^{3+} 量的摩尔比为 1: 1, 该储存量及能力与环境介质的 pH 值有关, 与 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等非过渡金属离子无关。经改造后的铁蛋白反应器预计可用于监测流动水域的有毒金属离子。

关键词 铁蛋白, 反应器, 储存离子, 有毒金属离子, 污染监测

中国图书分类号 X 17

铁蛋白(Ferritin)的主要生理功能是储存细胞或组织内过剩的铁, 避免铁中毒及适当地释放一定的铁量以补充细胞内缺铁现象^[1, 2]。此外, 铁蛋白还有强吸氢及直接从金属电极上接受电子等新的生理功能^[3, 4]。铁蛋白的分子结构是由蛋白壳(直径 100~ 120 埃)及铁核(2 000~ 4 000 Fe^{3+} /每分子马脾铁蛋白)组成。铁蛋白在水温高达 70 和 pH = 2~ 14^[5, 6]等较恶劣环境中不变性, 因而它是一种很特殊的蛋白质。

近几年来, 有关铁蛋白储存有毒过渡金属离子的研究已有较详细的报导。Mann 实验室曾把磁性物质组装到脱铁核铁蛋白中^[7]。黄河清把无机磷酸盐组装到马脾铁蛋白中^[8], Watt Richards 也把腺嘌呤核苷三磷酸三钠组装到铁蛋白壳内, 提出铁蛋白具有储存磁性物质和有机磷化合物能力的看法^[6]。1992 年, Hainfeld 成功地把放射性铀组装到脱铁核铁蛋白中并用于肿瘤治疗^[9]。1991 年, Mann 的实验室报导, 脱铁核铁蛋白能储存三氧化二锰于蛋白壳内并构成锰核^[10]。1995 年, Watt 实验室也报导了天然铁蛋白能储存若干种有毒的金属离子(Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+})等^[11]。显然, 铁蛋白对过渡金属离子有很强的储存能力。但迄今为止, 还未见详细报道有关阐明铁蛋白储存金属离子的规律、机理、建立分析动力学方程式及其它用途。

本文侧重研究在模拟海水流动水体系中, 铁蛋白反应器储存有毒金属离子的能力及规律, 其目的是把铁蛋白改造成能监测内海流动水域中污染程度的反应器。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验所需的马脾铁蛋白(Horse spleen ferritin, 简称 HSF)购于美国 Sigma 公司。猪脾铁蛋

白(Pig spleen ferritin 简称 PSF)的提取、纯化按黄河清等提出的方法^[12]。实验用的氯化锌、氯化钴、氯化镍、硫酸锰等均为化学纯

1.2 方 法

1) 铁蛋白反应器及模拟流动海水体系

铁蛋白反应器及模拟流动海水体系由蠕动泵、pH 酸度计、混合器、有毒金属离子容器、预混合反应池、分光光度计、铁蛋白反应器等组成(图 1)。蠕动泵(a)提供循环的流动海水,蠕动泵(b)负责把透析袋中的铁蛋白输入特制的比色池(图 2)中用于光谱测定和把样品输回透析袋中进行进一步的反应。pH 酸度计测定流动海水中的 pH 值及电位变化。混合器负责给流动海水体系配制不同浓度的有毒金属离子。分光光度计直接测定铁蛋白吸光值。铁蛋白反应器由磁力搅拌泵、磁棒、控温系统和反应袋(透析袋和铁蛋白)组成。透析袋的作用是固定铁蛋白及让海水中的微量有毒金属离子能自由进入透析袋并被铁蛋白所储存。

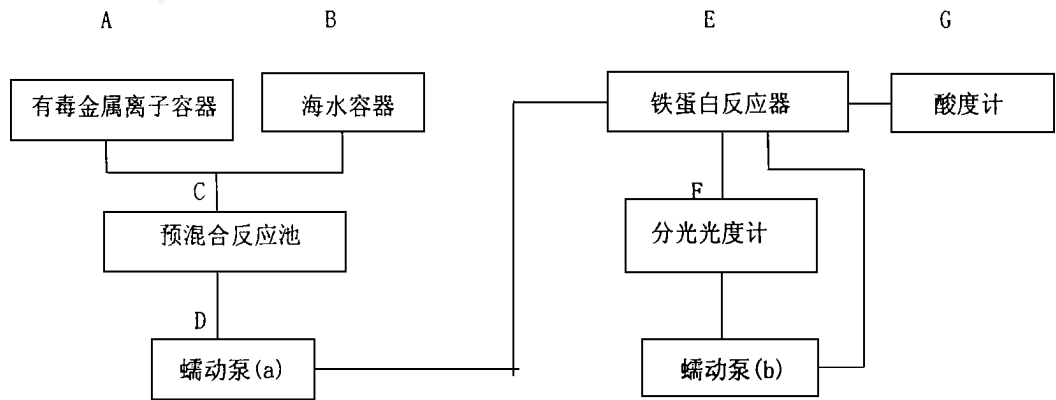


图 1 铁蛋白反应器及模拟流动海水体系示意图

Fig. 1 Reactor of ferritin and mim ic system of flow ing sea water

2) 特制比色池

图 2 是特制光谱测定比色池。该池可在分光光度计上连续测定流动水域中的铁蛋白的光谱特性及特定波长的吸收值(600 nm, 快速流动海水与蛋白混合监测的最佳波长)。比色池下端是进水口,上端是出水口。

3) HSF_N 含铁量及元素分析

脱铁核铁蛋白的制备参考文献[12]方法。脱铁核铁蛋白重新储存新的铁核(简称 HSF_N)的方法参考文献[10, 12]。HSF_N 蛋白浓度用常规的 Low ry 方法测定。标准蛋白浓度选用纯度为 98% 的牛血清白蛋白。HSF_N 的含铁量及储存其它有毒金属离子含量用原子吸收分光光度计或常规分光光度法测定。各种金属离子用去离子水配制浓度为 0.0200 mol/L。

4) PSF_N 和 HSF_N 储存有毒金属离子

配制有毒金属离子 Co²⁺ (CoCl₂)、Zn²⁺ (ZnCl₂)、Ni²⁺ (NiCl₂)和 Mn²⁺ (Mn SO₄)浓度为 1 × 10⁻³ mol/L。用海水(pH= 7.25)直接配制浓度为 1 mg/mL 的 HSF_N,注入铁蛋白反应器中并在波长为 450 nm 处监测铁蛋白的吸光值,接着由预混合反应池分别注入各种金属离子于铁蛋白

反应器中, 随后由蠕动泵把样品泵入流动比色池中, 用分光光度计测定铁蛋白的光谱特性

5) 不同 pH 值的 HSF_N 光谱特性测定

a) 用 0.05 mol/L NaOH 或 0.05 mol/L HCl 调节溶于海水的 HSF_N 溶液的 pH 值, pH 值分别为 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 稳定 2 h. b) 把不同 pH 值的 HSF_N 样品分别加入 20.0 × 3.0 cm Sephadex G-25 层析柱, 并用相对应的 pH 值的海水洗脱二次, 除去铁核中不稳定的铁和磷酸盐. c) 在波长 380~680 nm 处测定不同 pH 值的 HSF_N 的光谱特性

6) HSF_N 铁组分的稳定性

测定 HSF_N 铁组分稳定性装置由一根 20.0 × 3.0 cm Sephadex G-25 层析柱、蠕动泵、分光光度计和反应器组成. 用 pH = 7.25 海水作为 HSF_N 洗脱液. 铁蛋白通过层析柱进行循环洗脱. 用分光光度计 (450 nm) 监测 HSF_N 吸收光谱变化

7) HSF_N 耐盐能力

取 HSF_N (3.0 mg/mL) 样品 5 份, 每份 1.0 mL, 分别加入一定量的海水及不同的盐浓度, 反应体系总体积 5.0 mL, 搅拌 15 min. 随后把经处理的样品分别通过 1 根 20.0 × 3.0 cm Sephadex G-25 层析柱除去过剩的盐及收集 HSF_N. HSF_N 铁核中的铁含量按文献[13]测定

2 结果与讨论

2.1 HSF_N 在流动海水中的稳定性

图 3 结果表明, 脱铁核 HSF 有能力再次储存游离铁于蛋白壳内构成新的铁核, 其铁的储存量可高达 2 000 Fe³⁺/每分子 HSF_N (新铁核). 此外, 图 3 结果还表明, 构成新铁核的 HSF_N 经葡聚糖凝胶 G-25 层析柱反复洗脱 (海水洗脱) 高达 7 次后, HSF_N 铁核中绝大多数的铁均仍稳定于 HSF_N 的蛋白壳内, 并不随着用海水洗脱

次数递增而释放到反应体系中. 显然, HSF_N 储存体外的游离铁并不是简单的物理吸附, 而是以较强的价键结构方式储存于铁核中, 不易丢失. 推测其铁组分的价键结构的牢固性并不亚于天然铁蛋白铁核中的铁组分, 因而重新构建铁核的铁蛋白与天然的 HSF 均表现出相似的释放铁动力学特性及规律^[9~12].

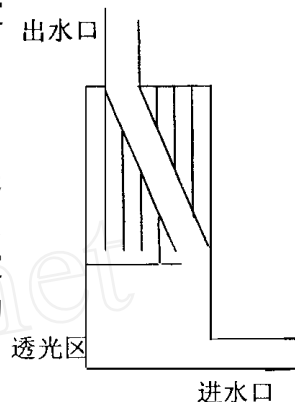


图 2 特制比色池

Fig. 2 Cuvette of particular production

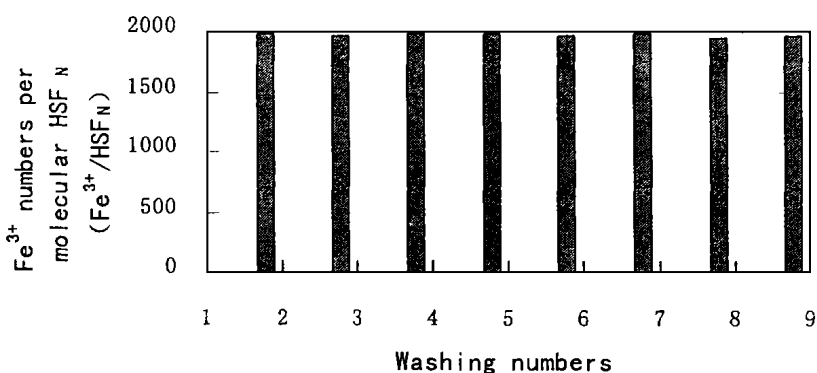


图 3 洗脱次数对 HSF_N 铁核中铁组分的稳定性的影响

Fig. 3 Effect of washing times on stability of iron component within the core of HSF_N

2.2 HSF_N 铁核耐盐特性

图4结果表明,HSF_N具有很强的耐盐能力。随着反应体系中的NaCl浓度由0.5%逐步递增到5%时,HSF_N铁核中的绝大多数铁仍稳定于铁核中,并不随海水中盐浓度的递增,而释放蛋白壳中的铁组分于蛋白壳外。显然,HSF_N铁核中的铁组分具有较强的抗盐能力,因为通常海水中的含盐量仅在千分之几十。如果把脱铁核HSF_N构建生物反应器并用于监测流动海水中的重金属污染程度时,铁蛋白所储存的铁或其它过渡金属离子很可能不受海水的盐浓度影响或盐浓度的变化而失去储存铁的能力或直接释放它于环境中。

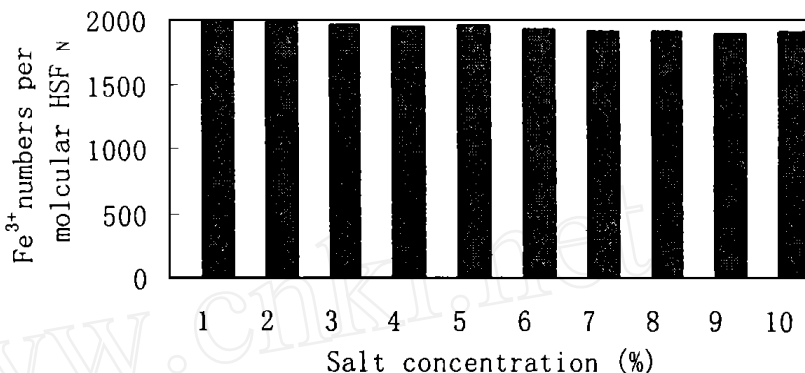


图4 HSF_N 铁组分在不同盐浓度的海水中的稳定性

Fig. 4 Stability of iron component of HSF_N in sea waters with different salt concentrations

2.3 不同pH 值对HSF_N 光谱特性的影响

图5结果表明,HSF_N在可见光谱区中没有明显的特征吸收峰。不同pH值的HSF_N蛋白在可见光谱区(350~520 nm)中的整体吸光强度不同,但均随波长的红移呈减弱趋势且有一定的相似性。从图5结果分析可知,HSF_N在可见光谱区中的吸光强度分别为 $A_{bSpH7.0} > A_{bSpH6.0} > A_{bSpH8.0} > A_{bSpH9.0} > A_{bSpH5.5} > A_{bSpH5.0}$ 。用原子吸收分光光度法或常规用原子吸收分光光度法或常规其铁量变化趋势为 $C_{pH7.0} > C_{pH6.0} > C_{pH8.0} > C_{pH9.0} > C_{pH5.5} > C_{pH5.0}$ 。此外,从图5结果可看出,HSF_N的吸光强度与它的铁核中的含铁量成对应的关系, H^+ (pH5.0~7.0), OH^- (pH7.0~9.0) 均能参与HSF_N铁核组成,使HSF_N直接释放一定量对酸碱不稳定的铁,并使铁蛋白在可见的光谱区中的整体吸收光谱强度随着释放铁量递增而下降。

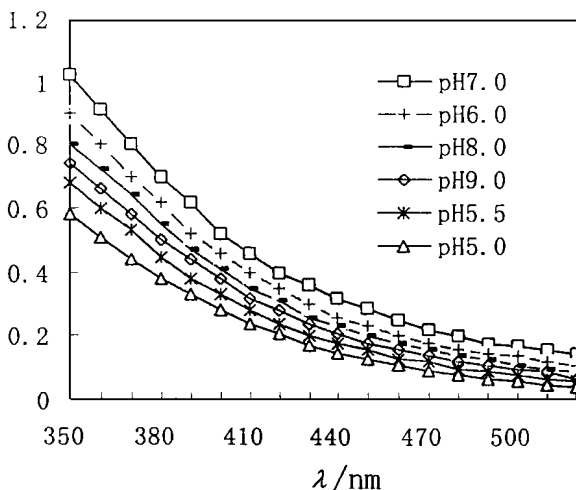


图5 不同pH 值条件下HSF_N 的光谱特性

Fig. 5 Spectral characteristics of HSF_N at different pH values

图5结果表明,当反应体系中的酸碱度发生变化时, H^+ 和 OH^- 均会直接影响HSF_N铁核中的部分对酸碱不稳定的铁组分,使其释放到蛋白壳外。但这一现象并不影响构建生物反应器及应

用于流动水体的污染监测,因为在流动水体的某一区域中的酸碱度在单位时间内是相对稳定的,通常变化不大。即使环境的 pH 变化较大,但 HSF_N 铁核中的多数铁仍稳定于铁核中,因而只要在定量分析过程中加入适当的校正因子后,仍可较准确地反映 HSF_N 中铁的丢失量及其金属离子储存量。

2.4 HSF_N 储存有毒金属离子特性

图 6 结果表明, HSF_N 分别已储存 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 。 HSF_N 储存金属离子,并同时释放相对应的铁量,因而在可见光谱区的光谱变化趋势相似,但吸光值不一样,它们的整体吸光值分别为 $A_{\text{bHSF}_\text{N}(\text{Ni})} > A_{\text{bHSF}_\text{N}(\text{Zn})} > A_{\text{bHSF}_\text{N}(\text{Mn})} > A_{\text{bHSF}_\text{N}(\text{Co})}$ 。此外,用分光光度计分别测定 HSF_N (Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+}) 可知, HSF_N 确实分别储存一定量的 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} ,但各自的储存量不同,差异较大。推测这一现象很可能与反应体系中的金属离子的浓度和特性,蛋白质结构及反应时间等诸多因素有关,因而需待进一步建立动力学方程及获得更多的实验结果,才能得出 HSF_N 储存有毒过渡金属离子规律。但初步的研究结果表明了 HSF_N 在储存一分子过渡金属离子的同时,也释放自身铁核中的一分子 Fe^{3+} 。此外,在反应体系中适当地配制一些碱金属离子(K^+)和碱土金属离子后,其研究结果表明该离子并不影响 HSF_N 储存 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 的能力或被储存,可见 HSF_N 对储存过渡金属离子有独特的专一性。显然, HSF_N 经过适当地改造后,该蛋白可用于构建生物反应器并用于监测流动水域中超微量有毒金属离子的含量及累积量,从而判断该流动水域的污染程度。

2.5 HSF_N 和 PSH_N 储存有毒金属离子特性比较

近期的研究已表明, HSF 和 PSF 释放铁的动力学规律及反应级数相似,但释放铁的速率却相差较大,这一现象与各自蛋白壳的自身调节能力有关^[5,14,15]。我们的实验结果也证实了两者脱铁核铁蛋白构成新铁核的铁量 ($2\,000\text{ Fe}^{3+}/\text{HSF}_\text{N}$ 和 $1\,650\text{ Fe}^{3+}/\text{PSF}_\text{N}$) 的确有明显差别,但储存过渡金属离子含量差别较小,这一现象与 Watt 实验室近期所报道 HSF 储存过渡金属离子的含量及规律较相似^[11]。

参 考 文 献

- 1 林庆梅, 黄河清. 马脾铁蛋白整体铁核铁磷组成的研究. 福建省科学技术协会第二届青年学术年会. 福建省科协第二届青年学术年会执行委员会编. 福州: 福建科学技术出版社, 1995: 181~184.
- 2 Theil E C. Ferritin, gene, regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. Annu Rev Biochem. 1987, 56: 289~315.
- 3 Huang H Q, Xu L S, Zhang F Z et al. H_2 uptake activity, spectra, reduction potentials, and kinetics of iron

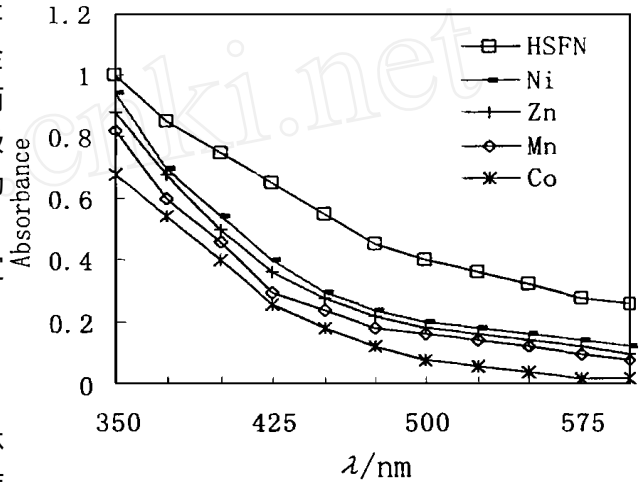


图 6 已储存有毒金属离子的 HSF_N 光谱特性

Fig 6 Spectral characteristics of HSF_N having stored metal ions of poisonous

- release on the surface of iron core from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J. protein Chem.* 1998, 17: 45 ~ 52
- 4 Huang H Q, Zhang F Z, Xu L S et al Spectroelectrochemical investigation of *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J. electroanal Chem.* 1998, 44: 301~ 307
 - 5 黄河清, 张凤章, 许良树 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较 *动物学报*, 1997, 43: 170 ~ 177
 - 6 Watt R K, Watt G D. Redox reaction of apo mammalian ferritin. *Biochemistry*, 1992, 31: 9 573~ 9 679
 - 7 Meldrum F C, Heywood B R, Mann M magnetoferritin. In vitro synthesis of a novel magnetic protein. *Science* 1992, 257: 522~ 523
 - 8 Huang H Q, Watt R K, Frankel R B et al Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen holoferritin. *Biochemistry*. 1992, 32: 1 681~ 1 687
 - 9 Hainfeld J F. Uranium-loaded apoferritin with antibodies attached: Molecular design for uranium neutron-capture therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 11 064~ 11 068
 - 10 Meldrum F C, Douglas T, Levi S et al Reconstituted of manganese oxide cores in horse spleen and recombinant ferritins. *J. of Inorganic Biochemistry* 1991, 58: 59~ 68
 - 11 Peard S, Durrant E, Webb B et al. *J. of Inorganic Biochemistry*. 1995, 59: 15~ 27
 - 12 Cheng Y G, Chasteen N D. Role of phosphate in initial iron deposition in apoferritin. *Biochemistry* 1990, 30: 2 593~ 2 574
 - 13 Watt G D, Frankel R B, Jacobs D et al Papaefthymiou G C. Fe^{2+} and phosphate interaction in bacterial ferritin from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 1992, 31: 5 672~ 5 679
 - 14 张凤章, 黄河清, 林庆梅等. 棕色固氮细菌铁蛋白释放铁的动力学方程和性质 *生物物理学报*, 1998, 14: 13~ 20
 - 15 黄河清, 林庆梅, 张凤章等. 猪脾铁蛋白电子隧道特性及释放铁途径的研究 *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15: 10~ 15

Primary Studies on Storage of Poisonous Metal Ions by A Ferritin Reactor

Lin Qingmei¹ Qiao Yuhuan² Huang Heqing²

(¹Res. Center of Envir. Sci., ²Dept of Biol., Xiamen Univ., Xiamen 361005)

Abstract The capacity and law that ferritin reactor storing poisonous metal ions were probed in imitating system of flowing seawater. A new iron core was constituted by apoferritin in vitro, in which most of iron components within the core were still stable after being treated by the seawater containing 5% NaCl. However, a few iron components sensitive to H^+ and OH^- within the iron core were directly released when pH in the medium increased or decreased in the reaction system. The ferritin had capacity to store some poisonous metal ions including Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} and release the relative iron within the core. The molecular ratio of the stored ions to the released iron was known to be 1:1. In addition, the capacity of ferritin to store metal ions was closely dependent on the pH of the medium and independent of the existence of non-transition metal ions such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} etc. A modified ferritin reactor is expected to be used for monitoring pollution degree of poisonous metal ions in flowing seawater.

Key words Ferritin, Reactor, Storing ions, Poisonous metal ions, Pollution monitor